

# Risikoanalyse durch eine wirkungsbezogenen Analytik mit der instrumentellen Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie in der Lebensmittelüberwachung

C. Weins und M. Oehme-Peter

Organische Analytische Chemie, Universität Basel, Schweiz

Korrespondenz an: Dr. Christel Weins, Max-Planck-Institut für Informatik, Stuhlsatzenhausweg 85, D-66123 Saarbrücken, Germany, Tel.: +49 (0)681 9325-404, Fax: +49 (0)681 9325-499, E-mail: weins@mpi-inf.mpg.de

Eingegangen: 30. Juni 2006; angenommen 1. August 2006

**Schlüsselwörter:** Wirkungsbezogene Analytik, Hochleistungs-dünnschichtchromatographie, Wirkungsäquivalente, Hormone, Estrogene, Pestizide, Antibiotika, Cholinesterase, Biolumineszenz.

Abkürzungen: AMD = Automated Multiple Development (deutsch: automatische Mehrfachentwicklung); ATCC = American Type Culture Collection; BChE/H = Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum; BSA = Rinderserumalbumin (engl. Bovine serum albumine); DC = Dünnschichtchromatographie; DIN = Deutsches Institut für Normung; FAB MS = Fast-Atom-Bombardement Mass Spectrometry; FTIR = Fourier - Transformation Infrarot (FTIR) Spektrometer; GC = Gaschromatographie; GDCH = Gesellschaft Deutscher Chemiker; GLP = Übereinkünfte für Gute Laborpraxis; HPLC = High Performance Liquid Chromatography (deutsch: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie); HPTLC = High Performance Thin - Layer Chromatography (deutsch: Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie); KG 60 = Kieselgel 60; MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation; MUG = 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-Galaktopyranosid; 4MU = 4-Methylumbelliferon; PCP = Pentachlorophenol; PSM = Pflanzenschutzmittel; RP = Reversed Phase (deutsch Umkehrphase); SIMS = Secondary Ion Mass Spektrometer; THF = Tetrahydrofuran; TLCThin = Layer Chromatography = Dünnschichtchromatographie.

**Zusammenfassung:** Als wirkungsbezogene Analytik wird die Kopplung von biochemischen bzw. biologischen Testverfahren an chemisch/physikalische oder chromatographische Verfahren bezeichnet. So lassen sich mittels der Dünnschichtchromatographie die aufgetrennten Komponenten direkt auf dem Chromatogramm physikalisch-chemisch detektieren und quantifizieren. Durch die Kopplung von biochemischen (z.B. enzymatischen Hemmtests) oder biologischen Testverfahren können toxikologisch wirksame Substanzen *in situ* nachgewiesen werden. Mit diesen biologischen Testsystemen können – direkt auf dem Chromatogramm auf der Dünnschichtplatte – Fungizide, Antibiotika und Lumineszenz-Hemmstoffen nachgewiesen werden; ein

neues molekularbiologisches Testverfahren ermöglicht den qualitativen und quantitativen Nachweis von Hormonen.

Mit biochemischen und biologischen Detektionsverfahren können Wirkstoffe in Lebensmittelproben sowie bei der Reinheitskontrolle und in der Metabolismusforschung von Chemikalien nachgewiesen werden. Außerdem können die detektierten Wirkstoffe durch ihre Migrationsstrecke und ihr UV-Spektrum charakterisiert oder auch identifiziert werden.

Pflanzliche Lebensmittel wurden mit der wirkungsbezogenen Analytik auf die Gegenwart von Pestiziden hin untersucht. Biochemische und biologische Detektionsverfahren auf dem Dünnschichtchromatogramm sind sehr selektiv und sensitiv und schließen damit die Lücke zwischen biologischen *in vitro*-Testverfahren und instrumenteller Analytik. Die Detektion von Wirkungsäquivalenten ist als Screening-Verfahren zunächst unabhängig von Referenzsubstanzen.

Neben verschiedenen Testverfahren wird ein Konzept zur Risikoanalyse und Risikobewertung vorgestellt, bei dem die wirkungsbezogene Analytik als Bindeglied zwischen Biotests und chemisch/physikalischen Analytik- und Identifizierungsverfahren fungiert.

## 1. Einleitung

### 1.1 Risikoanalyse zur Sicherheit von Lebensmitteln

In der Europäischen Union soll der höchste Standard für die Lebensmittelsicherheit gelten. Dies zu gewährleisten, ist eines der vorrangigen politischen Anliegen der EU-Kommission. Insofern hat die EU-Kommission durch die Einrichtung einer unabhängigen Europäischen Lebensmittelbehörde dafür gesorgt, ein hohes Maß an Lebensmittelsicherheit zu garantieren.

Die wirtschaftliche Bedeutung wie auch die Tatsache, dass wir täglich mit Lebensmitteln zu tun haben, belegen, dass die Lebensmittelsicherheit sowohl für die Gesellschaft insgesamt als auch und vor allem für Behörden und Erzeuger von hohem Interesse sein muss. Ein wirkungsvolles Risikomanagement kann nur erfolgen, wenn die Überwachung die gesamte Le-

bensmittelherstellungskette einschließlich der Futtermittelherstellung abdeckt. Dabei ist die Risikoanalyse die Basis für die Lebensmittelsicherheit. Die Europäische Union geht bei ihrer Lebensmittelpolitik von drei Einzelschritten der Risikoanalyse aus: Risikobewertung (wissenschaftliche Beratung und Informationsanalyse), Risikomanagement (Rechtsetzung und Überwachung) und Risikokommunikation.

Nach dem Weissbuch der EU für Lebensmittelsicherheit (2000) ist für eine angemessene amtliche Überwachung auf nationaler und europäischer Ebene zu sorgen, die insbesondere die Rückverfolgbarkeit der Lebensmitteln durch die gesamte Herstellungskette sicherstellen muss. Die Anforderungen, die an die Lebensmittelkontrollen gestellt werden, sind neben der Erarbeitung gerichtsfester Analysenverfahren auch die Gewährleistung eines hohen schnellen und preisgünstigen Probendurchsatzes.

### 1.2 Probleme des derzeitigen Analytikkonzepts

Der Einsatz biologischer Toxizitätstests sowie enzymatischer Hemmtests (z.B. der Agardiffusionstest für Antibiotika) als Screening-Verfahren in der Grund-, Trink-, Oberflächen-, Abwasseranalytik und bei Lebensmitteluntersuchungen bringt den ersten Hinweis für das Vorhandensein toxischer Schadstoffe in einer Umwelt- bzw. Lebensmittelprobe. Die Ergebnisse dieses „Biomonitorings“ zeigen in der Regel die Summeneffekte von Schadwirkungen in einem definierten Testsystem auf, wobei eine Einzelstoffidentifizierung zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich ist.

Der Beweis für die Anwesenheit eines oder mehrerer Schadstoffe, die für den toxischen Effekt im oben eingesetzten Testsystem verantwortlich sind, muss anschließend durch die instrumentelle Analytik, wie die Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie (HPLC, HPTLC) erbracht werden, mit der die Einzelstoffe mittlerweile in geringsten Spuren (im ng- bzw. pg-Bereich) identifiziert und quantifiziert werden können.

Die instrumentelle Analytik bedarf ihrerseits einer selektiven Anreicherung des Wirkstoffes aus der entsprechenden Matrix: Nach einer anschließenden selektiven Trennung erfolgt die Identifizierung mit Hilfe ausgewählter Referenzsubstanzen, an die sich die Quantifizierung des Wirkstoffes anschließt. Hier ergeben sich Schwierigkeiten bei der Verwendung relevanter Referenzsubstanzen. Nur die Substanzen, nach denen der Analytiker sucht, können gefunden werden, so dass bei der routinemäßigen Überwachung von Lebensmittel- und Umweltproben eine Erfassung unbekannter Substanzen oder Metabolite mit einer biologisch/toxikologischen Schadwirkung in der Einzelstoffanalytik nicht erfolgt.

Von den heute rund 5 Mio. bekannten chemischen Verbindungen sind etwa 80.000 Chemikalien in Gebrauch, davon 600 Pestizide. Jährlich kommen etwa 500–1.000 neue Chemikalien dazu. Durch die zivilisatorische Entwicklung sind zudem Materialkreisläufe stark beschleunigt worden (Fent, 1998). Bei einer Schadstoffpalette von über 30.000 relevanten Chemikalien und deren Abbauprodukten ist die Überwachung durch eine Einzelstoffanalytik überfordert.

Die Geschichte der Schadstoffanalytik zeigt, dass die Einzelstoffanalytik prioritärer Schadstoffe das Risikopotential nur

unzureichend abbildet und daher kein geeignetes Instrument des Risikomanagements im Sinne eines vorsorgenden Verbraucherschutzes darstellt. Chemikalien gelangen zum Teil entweder direkt oder auf Umwegen in die Nahrungskette und können in vielfältiger Weise auf Pflanzen, Tiere und nicht zuletzt auf den Menschen einwirken. Wenig erforscht ist die Art und Weise, wie sich Chemikalien in der Umwelt ausbreiten, wo sie akkumulieren oder abgebaut werden und wie sie schließlich auf die verschiedenen Organismen wirken. Mit den konventionellen analytischen Verfahren und experimentellen Untersuchungen, die eine umfassende Beurteilung des Risikopotentials einer Chemikalie zuließen, sind diese Untersuchungen zeitaufwendig und teuer. Dazu kommt, dass viele Substanzen in der Natur durch die Einwirkung von Sonnenlicht oder Mikroorganismen abgebaut werden. Die Wahrscheinlichkeit, für die dadurch entstehenden, potentiell gefährlichen Substanzen geeignete Daten mit den herkömmlichen Instrumenten zu finden, ist derzeit äußerst gering.

### 1.3 Wirkungsbezogene Analytik: ein Konzept zur Erfassung von Wirkungsäquivalenten in einer Probe

Bei der wirkungsbezogenen Analytik sind zwei unterschiedliche Verfahren miteinander gekoppelt. Zum einen wird für die Schadstoffanalytik ein analytisches Verfahren in der Spurenanalytik für die Bestimmung ausgewählter organischer Schadstoffe eingesetzt, zum anderen schließt sich nach der physikalisch/chemischen Auswertung ein biologischer bzw. ein biochemischer Toxizitätstest an und ermöglicht somit nach der chemisch/physikalischen Charakterisierung der Probe eine direkte wirkungsbezogene Beurteilung.

Der 1. Schritt besteht aus einer Bestimmung organischer Schadstoffe mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik im Spurenbereich in der High-Performance Thin-Layer Chromatographie (HPTLC). Die chromatographische Auftrennung der Substanzen erfolgt mit einem Universalgradienten aufgrund ihrer Polarität. Die Identifikation und Bestimmung wird durch *in-situ*-Remissionsmessung bei 7 Wellenlängen (200–320 nm) durchgeführt. Die Identifikation einzelner Stoffe erfolgt zunächst – wie in der HPLC – aufgrund der Lage im Chromatogramm und mit Hilfe einer Spektrenbibliothek anhand des Remissionsspektrums. Die Nachweisgrenze ist hierbei in der Regel abhängig vom Adsorptionskoeffizienten des entsprechenden Stoffes oder Derivates.

Im 2. Schritt werden auf dem gleichen Chromatogramm mittels einer Kopplung mit einem biologischen/biochemischen Toxizitätstest die Wirkstoffe detektiert, die den entsprechenden Organismus im Testsystem schädigen. Hierbei können Testorganismen, wie Pilzsporen, Hefezellen oder Bakterien bzw. auch Zellorganellen (z.B. Chloroplasten) in einem entsprechenden Nährmedium auf das Chromatogramm gebracht werden. Das biologische Signal wie Hemmung oder Stimulation des Wachstums, Hemmung oder Stimulation der Lumineszenz oder Hemmung der Photosynthese dient zum einen der Zuordnung von toxischen Substanzen im Chromatogramm oder weist zu anderen auf unbekannte toxikologisch relevante Stoffe erst hin. Neben den Einsatz von organismischen oder suborganismischen Testverfahren können postchromatographisch auf der Dünn-

schichtplatte auch Enzymhemmtests als biochemischer Marker für toxikologisch relevante Stoffe durchgeführt werden.

Die Dokumentation kann per Flachbettscanner oder per Videokamera erfolgen und die Hemmung in definierten Toxizitätseinheiten mit Hilfe der Bildanalyse quantitativ angegeben werden. Die Nachweisgrenze ist hierbei abhängig von der Toxizität des entsprechenden Stoffes in diesem definierten Testsystem.

#### 1.4 Allgemeines Prinzip der biologischen bzw. biochemischen Detektionsverfahren auf der stationären Phase

Bei den zellulären bzw. subzellulären Detektionsverfahren in der HPTLC wird das Chromatogramm vom Fließmittel befreit; nach der physikalischen Auswertung können bioaktive Schadstoffe mit Hilfe zellulären und subzellulären Testverfahren postchromatographisch auf dem Chromatogramm detektiert werden (Abb. 1).

In der Regel wird das Chromatogramm 3 sec. in die wässrige Zellsuspensionslösung bzw. Enzymlösung getaucht; die überschüssige Lösung wird am Boden der Platte z.B. mit Löschpapier abgezogen. Je nach Testverfahren kann die Platte direkt vermessen werden (z.B. beim Biolumineszenztest) oder wird in einer Umgebung mit einer hohen Luftfeuchte inkubiert, je nach Testverfahren von 20 min (z.B. Enzymhemmtest) bis 46 h (z.B. beim Enzyminduktionstest bei transgenen Hefen).

Die daraus resultierende Wirkung kann z.B. bei Wachstumshemmungen bei *Penicillium*sporen durch Fungizide daraufhin direkt vermessen oder die Detektion des toxikologischen Effektes kann durch eine anschließende biochemische Reaktion sichtbar gemacht werden. Durch die Zugabe eines entsprechenden Substrats kann z.B. entweder eine Enzyminduktion oder Enzymhemmung nachgewiesen werden.

## 2. Materialien und Methoden

Die wirkungsbezogene Analytik ist ein leistungsfähiges Instrument für die Risikobewertung von Chemikalien und Wirkstoffen sowie von Umwelt- und Lebensmittelproben.

### 2.1 Probenvorbereitung für die wirkungsbezogene Analytik

Durch die wirkungsbezogene Analytik mittels Dünnschichtchromatographie können Wirkstoffe aus unterschiedlichen Anwendungsgebiete selektiv in verschiedenen und komplexen Matrices aufgefunden gemacht werden. Im Gegensatz zu der Einzelstoffanalytik erlaubt die Dünnschichtchromatographie eine Probenvorbereitung derart, möglichst alle organischen Bestandteile einer Probe zu erfassen. Mit eben diesem Ziel ermöglicht sie sogar die Probenvorbereitung aus Rohextrakten oder nativen Proben während der Chromatographie auf der Platte.

#### 2.1.1 Futtermittel

10 g des zu analysierenden Futtermittels werden in einem Mörser zerrieben, mit 10 ml Methanol versetzt und über Nacht unter Lichtausschluss geschüttelt. Die Probe wird abfiltriert und der Rückstand nochmals mit 5 ml Methanol gewaschen. Die vereinigten methanolischen Lösungen werden abgedampft und auf ein Volumen von 10 ml mit Methanol aufgefüllt (Eymann et al., 2001).

#### 2.1.2 Pflanzliche Lebensmittel

Pestizide wurden aus den pflanzlichen Lebensmitteln gemäß dem deutschen Einheitsverfahren extrahiert (DFG S19). Hierbei wurden 100 g pflanzliches Untersuchungsmaterial mit Aceton versetzt. Dabei wird soviel Wasser zugegeben, dass unter Berücksichtigung des natürlichen Wassergehalts der Probe das Verhältnis Aceton:Wasser während der Extraktion jeweils 2:1 Volumenteile beträgt. Zu dieser Lösung bzw. zum filtrierten Extrakt gibt man Dichlormethan, wobei sich überschüssiges Wasser abscheidet. Der Abdampfrückstand der organischen Phase wird durch eine Gelpermeationschromatographie an dem Polystyrol Bio-Beads S-X3 durch Elution mit einem Cyclohexan-Essigsäure-Gemisch gereinigt. Von der rückstandshaltigen Fraktion, die auf eine Konzentration von 4,5 g Untersuchungsmaterial/ml eingestellt wurde, wurden für die Analyse 50–100 µl Extrakt auf die HPTLC Platte appliziert.

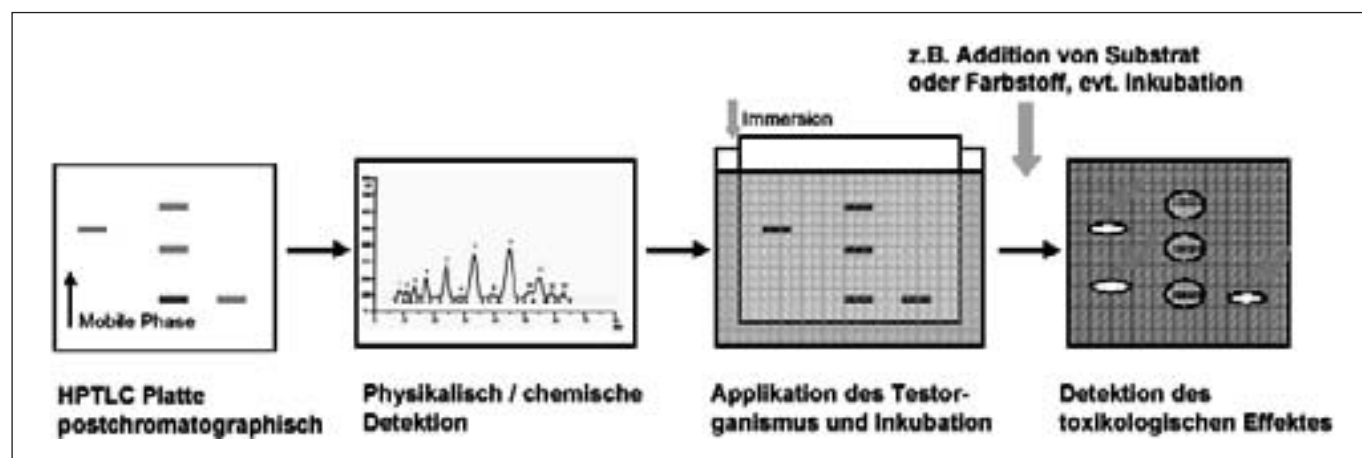


Abb. 1 Allgemeine Vorgehensweise der toxikologischen Schadstoffbestimmung mit zellulären und subzellulären HPTLC-Detektionsverfahren.

## 2.2 Experimentelle Bedingungen

### 2.2.1 Chemikalien

Lösungsmittel für die HPTLC-AMD wurden in Lichrosolv-Qualität (Merck, Darmstadt, BRD) verwendet; alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität eingesetzt. HPTLC-Kieselgel 60 Platten F254 10 × 20 cm, Schichtdicke 200 µm wurde von Merck 5642, Darmstadt, BRD, und Cholinesterase aus Rinderserum, Rinderserumalbumin, Echtblau B und Naphthylacetat von Merck, 5642 Darmstadt, BRD bezogen.

### 2.2.2 Geräte

AMD2 (CAMAG, Muttenz, Schweiz), Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz), TLC Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Schweiz), Tauch-Gerät (BARON, Insel Reichenau, BRD), Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), CabUVIS (DESAGA, Heidelberg, BRD) und feuchte Kammer aus Glas (20 × 20 cm).

### 2.2.3 Reinigung der HPTLC-Platten

Für quantitative Untersuchungen wurden vor der Applikation der Proben die HPTLC-Platten vollständig für mindestens 8 h in 2-Propanol eingetaucht und anschließend 30 min bei 110°C aktiviert.

## 2.3 Chromatographische Bedingungen und Detektion mit UV (Mehrwellenlängenscan)

### 2.3.1 Chromatographie mit der AMD

Die Auftrennung der Substanzen in der Normalphasen-Dünnschichtchromatographie erfolgt mit einem Universalgradienten aufgrund ihrer Polarität mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik gemäß DIN 38 407 Teil 11. Der Gradient ist ein 33 Stufengradient basierend auf Dichlormethan, der mit Acetonitril als polare Komponente beginnt und mit n-Hexan als unpolare Komponente endet. Eine mögliche Identifikation und Bestimmung von Einzelstoffen kann somit durch eine *in-situ*-Remissionsmessung bei 7 Wellenlängen (200 nm–320 nm) durchgeführt werden. Die Identifizierung einzelner Stoffe erfolgt einerseits aufgrund der Lage im Chromatogramm und andererseits mit Hilfe einer Spektrenbibliothek anhand des Remissionsspektrums.

### 2.3.2 Dünnschichtchromatographie der Futtermittel

50 nl des Futtermittelextraktes sowie auf zwei Parallelbahnen 5 ng Chlortetracyclin bzw. 2 ng Penicillin G-Procaïn (jeweils 0,01%ige methanolische Lösung) werden punktförmig mit einer Hamilton-Spritze auf eine HPTLC-Platte Kieselgel 60 WRF254s 15 mm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen. Die Entwicklung der Platte erfolgt in einer Normalkammer ohne Kammersättigung mit Acetonitril als Fließmittel auf eine Laufhöhe von 40 mm (Eymann et al., 2001).

## 2.4 Postchromatographischer Nachweis von bioaktiven Schadstoffen

Das Chromatogramm wird vom Fließmittel befreit und nach der physikalischen Auswertung können bioaktive Schadstoffe mit Hilfe organischer und suborganischer Testverfahren postchromatographisch auf dem Chromatogramm detektiert werden. Das jeweilige Chromatogramm wird 3 sec in

die organismische Suspensionslösung bzw. Enzymlösung getaucht und die überschüssige Lösung wird am Boden der Platte mit Haushaltspapier abgezogen.

### 2.4.1 Detektion der Biolumineszenzhemmung von *Photobakterium phosphoreum*

Das Photobakterium *Vibrio fischerii*, Stamm NRRL B-11177 gefriergetrocknet, wurde gemäß DIN 38 412 Teil 32 rekonstituiert. Die Zellen wurden in einem Vollmedium nach einem Verfahren, dass in DIN 38 412 Teil 34 beschrieben wird, kultiviert, 20 h auf einem Schüttelgerät (150 rev per min) bei 21°C. Bei der Detektion von Inhibitoren der Biolumineszenz wird die Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischerii* mit einer gekühlten CCD-Kamera bei einer Belichtungszeit von 600–800 sec. direkt auf dem Chromatogramm dokumentiert.

### 2.4.2 Detektion fungizider und bakterizider Wirkstoffe

*Bacillus subtilis*, ATCC 6633, wurde von der Fa. Merck als Sporensuspension bezogen und in einer entsprechenden Tauchlösung 2 h bei 30°C für die Dünnschichtchromatographie inkubiert (Eymann et al., 2001).

Penicillium- und Hefestämme (z.B. *Penicillium expansum* ATCC 7861) wurden auf Sabouraud Agar kultiviert. Die Sporen von *Penicillium*-Spezies wurden für den Test in einer Glucose-Mineralisalzlösung suspendiert (Hostettmann, 1997), während die Hefestämme in einem Sabouraud Flüssigmedium (3–4 Stunden Wachstum vor dem Test) mit 0,035% Gelrite® inkubiert wurden.

Bei der Bestimmung von fungiziden bzw. bakteriziden Stoffen werden die HPTLC-Platten in einer feuchten Kammer 16 h bei 25°C inkubiert. Auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator, der bei 254 nm angeregt wird, werden die durch Fungizide bzw. Antibiotika hervorgerufenen Hemmhöfe bereits nach 16 h Inkubation bei einer Bestrahlung der Platte mit 254 nm mit Hilfe der Videodokumentation aufgezeichnet. Die Vitalität der Bakterien wird durch Besprühen des bewachsenen Chromatogramms mit einer Lösung eines Tetrazoliumsals (MTT-Lösung 3 mg/ml) dargestellt. Anschließend wird die Platte in der Laborluft getrocknet und mit einem Flachbettscanner dokumentiert.

### 2.4.3 Detektion estrogener Verbindungen mittels transgener Hefen

Der verwendete rekombinante estrogensensitive Hefestamm (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde von der Genetischen Abteilung der Firma Glaxo, England, entwickelt. Die Hefezellen wurden mit dem Gen für den menschlichen Estrogen-Rezeptor (hER) transformiert; zusätzlich enthalten sie ein Expressionsplasmid. Dieses Plasmid besteht aus einer estrogenrezeptorbindenden DNA-Sequenz („estrogene responsive element“ = ERE), dem Reporter-Gen Lac-Z und einer Promotorsequenz. Das Lac-Z-Gen stammt ursprünglich aus dem Lactose-Operon von *Escherichia coli* und ist das Strukturgen für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase (Müller et al., 2004).

Das zelluläre Testverfahren zur Detektion von estrogener Wirksamkeit gliedert sich in drei Verfahrensschritte:

1. Immobilisierung der Organismen auf der lösemittelfreien Kieselschicht und Schaffung guter Wachstumsbedingun-



gen auf der Schicht mit Kontakt der Zellen mit den zu untersuchenden Verbindungen (vergleiche Kapitel 2.5.2). Die von organischen Lösungsmitteln befreite HPTLC-Platte wird 3 sec in eine 24 h alte estrogensensitive Hefekultur getaucht und die überschüssige Lösung wird am Boden der Platte mit Haushaltspapier abgezogen und bei 32°C inkubiert.

2. Es erfolgt die Substratumsetzung zum Nachweis des gebildeten Enzyms unter Berücksichtigung der optimalen Bedingungen für die entsprechende Enzymaktivität. Nach einer Inkubationszeit von ca. 26 h wird zum Nachweis der induzierten  $\beta$ -Galaktosidase das fluorogene Substrat 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-Galaktopyranosid (MUG) auf die Platte gesprüht. Innerhalb von 3 h bei 32°C wird dieses Substrat durch die  $\beta$ -Galaktosidase in Galaktose und das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon (4MU) gespalten.
3. Für die optische Quantifizierung des gebildeten Substrats sind optimale Detektionsbedingungen nötig. Das Emissionsmaximum des 4MU liegt im alkalischen pH-Bereich (pH-Wert >8) bei  $\lambda = 460$  nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm) und damit im sichtbaren Bereich. Es konnte sowohl visuell als auch mit einem Densitometer unter Verwendung einer Quecksilber-Lampe ( $\lambda_{\text{ex}} = 366$  nm) detektiert werden. Zur Erhöhung des pH-Wertes und somit zur Fluoreszenzverstärkung wird die Platte 5 Minuten in einer Doppeltrogkammer mit Ammoniak bedampft (Stahl, 1967). Die Testdauer konnte im Hinblick auf das *in vitro*-Testverfahren um 20 h verkürzt werden. Durch den Einsatz des fluorogenen Substrats 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-Galaktopyranosid (MUG) konnte die Inkubationszeit um die Hälfte reduziert und die Detektionsgrenze von 17 $\beta$ -Estradiol um den Faktor 20 gesteigert werden im Vergleich zu dem herkömmlichen Substrat Chlorophenol-Rot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (CPRG).

#### 2.4.4 Cholinesterasehemmtest

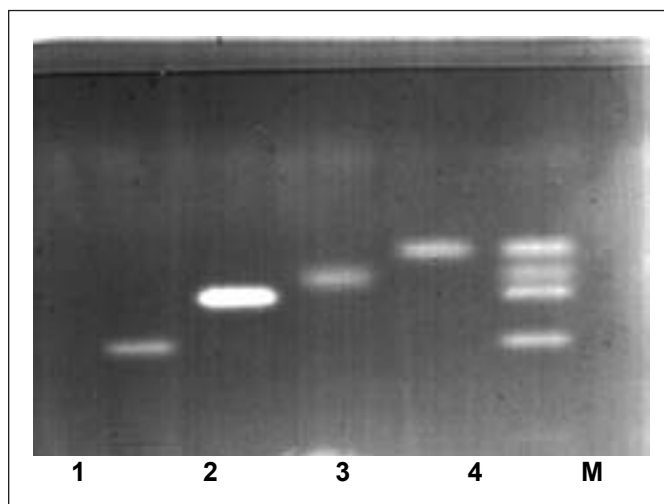
Die Detektion der Cholinesterase-Inhibitoren erfolgte mithilfe des Cholinesterasehemmtests; die Hemmwirkung wird durch die verminderte enzymatische Hydrolyse von 1-Naphthylacetat zu 1-Naphthol und Essigsäure und anschließender Kupplung des 1-Naphthols zu einem violettblauen Farbstoff (Diazoniumsalz Echtblau B) nachgewiesen. Es entstehen an den Stellen, wo sich toxikologisch wirksame Substanzen befinden, weiße Hemmzonen auf farbigem Untergrund (Weins und Jork, 1996).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Detektion von Inhibitoren der Cholinesterase

##### 3.1.1 Bestimmung von Detektionsgrenzen

Der Cholinesterase-Hemmtest ist ein sensitives und selektives biochemisches Verfahren, um phosphororganische Insektizide und insektizide Carbamate qualitativ zu bestimmen. Thio- bzw. Dithiophosphorsäureester können durch die Umsetzung mit dem Oxidationsmittel  $\text{Br}_2$  in ihre analogen toxikologisch wirksameren Phosphonate überführt werden. Auf der Dünnschichtplatte wird die Hemmwirkung durch die verminderte enzymatische Hydrolyse von 1-Naphthyl-acetat zu 1-Naphthol und Essigsäure und anschließender Kupplung des 1-Naphthols zu einem violettblauen Farbstoff (Diazoniumsalz Echtblau B)



**Abb. 2** Postchromatographische Detektion von Paraoxon-Methyl 0.4 ng/Fleck (1), Paraoxon-Ethyl 2 ng/Fleck (2), Naled 0.4 ng/Fleck (3), Dichlorvos 2 ng/Fleck (4) sowie Mischung aus 1-4 mit dem Cholinesterase Inhibitions-test (M). Stationäre Phase HPTLC KG 60 F254 (10X10); mobile Phase THF-n-Hexan: 7:25 v/v, Migrationsstrecke 5 cm; Migrationszeit 15 min; Dokumentation Flachbettscanner von Hewlett Packard.

nachgewiesen. Beim Kontakt des Enzyms mit den Inhibitoren auf der Dünnschichtplatte entstehen weiße Hemmzonen auf farbigem Untergrund. Die Platte wird 2 Sekunden in die Enzymlösung getaucht, 30 min bei 30°C in inkubiert und anschließend 2 Sekunden in die Substratlösung getaucht, um die Enzymreaktion zu starten (Weins und Jork, 1994) (Abb. 2).

Diese Farbreaktion ermöglicht es, verschiedene cholinesterasehemmende Insektizide aus der Gruppe der Carbamate und der Organophosphate aufgrund ihrer toxikologischen Wirksamkeit nach der chromatographischen Trennung auf der HPTLC-Platte nachzuweisen. Neben den Testbedingungen auf der Platte ist die Detektionsgrenze abhängig von der jeweiligen Hemmkonstante  $K_i$  des Wirkstoffes:  $K_i$  ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Inhibitor-Enzymkomplexes. Sie ist eine Stoffkonstante und hängt von der chemischen Struktur des Inhibitors ab. Je größer  $K_i$  ist, umso schneller bildet sich der Inhibitor-Enzymkomplex, umso niedriger liegt die Detektionsgrenze bei der postchromatographischen Detektion auf der Dünnschichtplatte und umso selektiver ist das enzymatische Detektionsverfahren. Die Hemmkonstante stellt somit bei Schadstoffen ein Maß für die Toxizität gegenüber einem Ziel-Enzym dar.<sup>1</sup> (Tab. 1).

##### 3.1.2 Untersuchung der Lebensmittelproben auf Insektizide

Parallel wurden Extrakte von Karotten und Salat auf Insektizide – mit der Eigenschaft als Cholinesteraseinhibitoren zu fungieren – untersucht. In Abbildung 3 ist deutlich zu erkennen, dass eine der vier Salatproben mit einem Cholinesteraseinhibi-

<sup>1</sup> Einige Pestizide und ihre Metaboliten zeigen Unterschiede der Hemmkonstanten gegenüber den Cholinesterasen bis zu einem Verhältnis von 1:500. Viele Phosphorsäure-Derivate, insbesondere die Thio- und Dithiophosphorsäure-Derivate zeigen gegenüber Cholinesterasen nur eine sehr geringe Inhibitionswirkung. Sie können aber durch eine Oxidation zu Phosphorsäure-Analogen in ihrer inhibitorischen Wirkung bis um den Faktor 1000 gesteigert werden.

**Tab. 1** Detektionsgrenzen cholinesterasehemmende Insektizide auf der Kieselgelplatte.

Insektizide	Detektionsgrenze [ng/5 mm Band]	Hemmkonstante $K_i = [L/mol^{-1} \times min^{-1}]$ (Herzsprung, 1991)
Paraoxon-ethyl	0,013 ng	$4,9 \times 10^5$
Paraoxon-methyl	0,400 ng	$2,2 \times 10^4$
Dichlorvos	0,100 ng	$5,2 \times 10^4$
Mevinphos	0,200 ng	$1,4 \times 10^4$
Cabaryl	0,200 ng	$2,7 \times 10^4$
Aldicarb	0,400 ng	$1,6 \times 10^4$
Butoxycarboxim	0,100 ng	$3,2 \times 10^3$
Butocarbocim	0,800 ng	$1,6 \times 10^3$
Oxamyl	0,800 ng	$1,4 \times 10^5$

tor belastet ist. Hier besteht der Verdacht einer Kontamination der Probe mit einem insektiziden Pestizid, z.B. Methiocarb oder einem Metaboliten von Mercaptodimethur. Alle 4 Extrakte aus den verschiedenen Chargen von Karottenproben weisen einen charakteristischen Substanzgehalt an Inhibitoren der Cholinesterase auf. Da die instrumentelle Analytik keine Belastung gängiger Pestizidwirkstoffe bestätigen konnte, sollten hier durch die Extraktion freigesetzte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe diskutiert werden, die als pflanzliche Insektizide fungieren können. Insgesamt wurden in 10 von 35 Proben 1–4 Wirkstoffe als Kontaminanten detektiert.

### 3.1.3 Aussagemöglichkeiten enzymatischer Hemmtests gekoppelt an die HPTLC

In der Dünnschichtchromatographie lassen sich die getrennten Komponenten direkt auf dem Chromatogramm physikalisch-chemisch detektieren und quantifizieren. Durch Koppelung von biochemischen (enzymatischen Hemmtests) ist es möglich, toxikologisch wirksame Substanzen *in situ* nachzuweisen. Die Testverfahren wurden durch Modifikationen, definierte Versuchsbedingungen und durch den Einsatz instrumenteller Methoden reproduzierbar und standardisierbar. Somit erlaubt die moderne instrumentelle Dünnschichtchromatographie, aufgrund toxikologischer Wirksignale den

Schadstoffgehalt von Einzelstoffen auch quantitativ zu bestimmen und die Methode zu validieren. Die Nachweisgrenze einzelner Wirkstoffe ist abhängig von der Hemmkonstanten der jeweiligen Substanz und kann im unteren Pikogramm Bereich liegen. Eine Quantifizierung der Wirkung ist sowohl mit biochemischen als auch mit biologischen Testverfahren möglich. Je toxischer eine Substanz auf ein bestimmtes Testsystem wirkt, umso niedriger liegt ihre Nachweisgrenze. Schadstoffwirkungen unbekannter Substanzen können in Wirkungsäquivalenten von bekannten Toxinen ausgedrückt werden. Aufgrund des Retentionsfaktors (hRF-Wert) einer Substanz im Chromatogramm und der Kombination mit den enzymatischen Reaktionen lassen sich Aussagen über die Polarität bzw. Lipophilie dieser Substanz machen, die wiederum gegebenenfalls toxikokinetische und toxikodynamische Aussagen über die detektierten Schadstoffe zulassen.

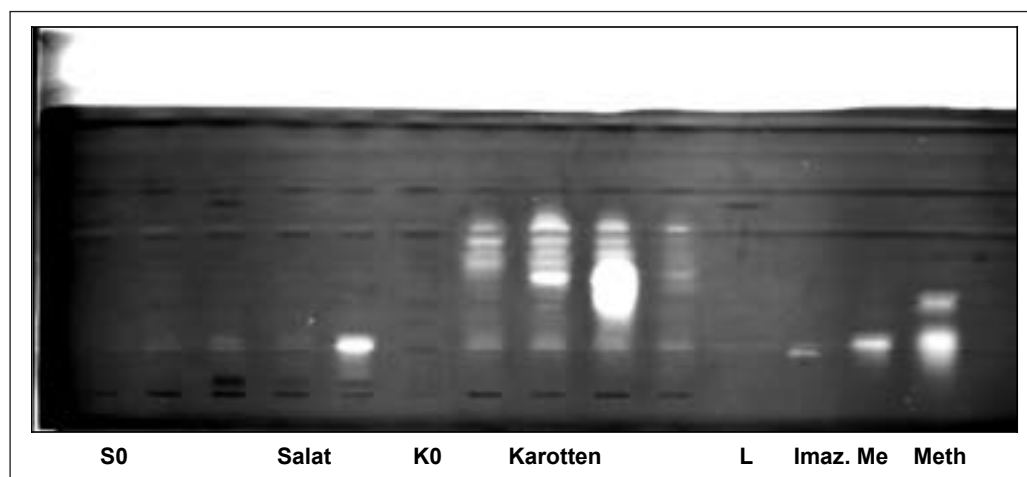
Neben der Cholinesterase können weitere Enzyme als Toxizitätstests für bestimmte Schadstoffe bzw. Klassen auf der Dünnschichtplatte herangezogen werden (Tab. 2).

## 3.2 Detektion von Antibiotika in Futtermittel

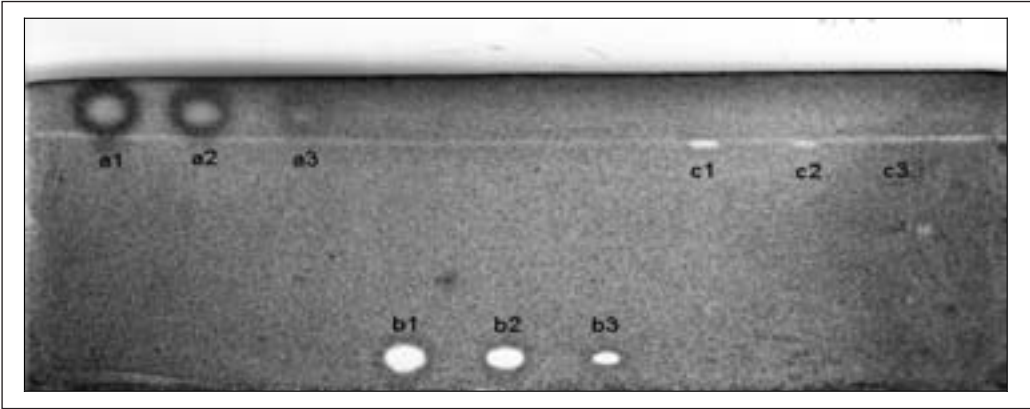
### 3.2.1 Detektionsgrenzen von Futtermittel-relevanten Antibiotika

Die Notwendigkeit, antibiotisch wirksame Substanzen qualitativ und quantitativ zu analysieren, hat in der jüngsten Vergangenheit deutlich zugenommen. Dies gilt nicht nur für den Umweltbereich und bei der Suche nach neuen synthetischen und natürlich vorkommenden pharmazeutischen Wirksubstanzen, sondern auch für die Rückstandsanalytik in Lebens- und Futtermitteln (Eymann, 2001). Abbildung 4 zeigt die Wirkung der drei Futtermittel-relevanten Antibiotika Chloramphenicol, Oxytetracyclin und Lasalocid, postchromatographisch auf der HPTLC-Platte auf das Wachstum von *Bacillus subtilis*.

Die wirkungsbezogene Detektion von bakterientoxischen Substanzen ist aufgrund der Vereinfachung und Optimierung bereits nach einer Inkubationsdauer der Testorganismen auf der Kieselgelschicht von 16 h auswertbar. Als Testorganismus in der HPTLC hat sich *Bacillus subtilis* für die Detektion zahlreicher Antibiotika sehr sensitiv erwiesen (Hamburger, 1985) und liegt bei Chloramphenicol bei 5 ng/4 mm Band. Die Detektionsgrenze von Oxytetracyclin liegt unter 5 ng/4 mm Band und bei Lasalocid bei 10 ng/4 mm Band.



**Abb. 3** Gegenwart von Cholinesteraseinhibitoren in verschiedenen pflanzlichen Lebensmittelproben, SO Kontrolle Salat, 4 Salatproben, KO Kontrolle Karotten, L Leerbahn, Standards: Imazalil 10 ng, Mercaptodimethur 30 ng, Methiocarb 30 ng, stationäre Phase HPTLC KG 60 F254, Format: 10 × 20 cm; Schichtdicke 200 µm; chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Mutz, Schweiz), Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD).



**Abb. 4** Detektion von Antibiotika postchromatographisch auf der HPTLC-Platte; stationäre Phase: KG 60 WRF 254s (MERCK, Art. Nr. 12363); Format: 10 × 20 cm; Schichtdicke 100 µm; Mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Ammoniak 25% 60/20/2 (v/v/v); a1–a3 = Chloramphenicol; b1–b3 = Oxytetracyclin; c1–c3 = Lasalocid; jede Komponente 25 ng, 15 ng, 5 ng pro Fleck; Testorganismus: *Bacillus subtilis*.

**Tab. 2** Mögliche Enzymsysteme zur Detektion von Schadstoffen.

Enzymsysteme	Inhibitorische Schadstoffe und Schadstoffklassen
Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Cholinesterase, alkalische und saure Phosphatase	insektizide Carbamate, insektizide Organophosphate, Organochlorverbindungen und ihre Metabolite (F. Geike 1969), Phenylharnstoff-Herbizide nach UV-Bestrahlung (Geike 1973)
Urease, Amylase, δ-Aminolävulinsäure Dehydratase	Schwermetalle und metallorganische Fungizide (Mendoza und Schields, 1973; Geike, 1972; Geike, 1974)
Pflanzliche und Säugetier-Peroxidase	Quinone (Mendoza and Schields 1973), aromatische Amine (Geike, 1970; Geike, 1975))
Katalase	2,4-Dichlorophenol, Hydroxylamine, Monochloramine, Nitrite (Mendoza and Schields, 1973)

locid konnte eine Detektionsgrenze von 15 ng/4 mm Band unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ermittelt werden.

3.2.2 Aussagemöglichkeit der wirkungsbezogenen Analytik über das Vorhandensein von Antibiotika

Bei der Überwachung der Futtermittel auf Antibiotika mittels der wirkungsbezogenen Analytik können eine Reihe bekannter Antibiotika nachgewiesen und quantifiziert werden. Ebenso ist die wirkungsbezogene Analytik mit der HPTLC ein geeignetes Instrument, Wirkungsäquivalente unbekannter Antibiotika aufzuspüren und sowohl durch die Lage im Chromatogramm als auch durch physikalisch/chemische Detektionsverfahren zu charakterisieren und gegebenenfalls zu identifizieren. In Tabelle 3 sind weitere Bakterienstämme aufgelistet, die es ermöglichen, die große Anzahl an Antibiotika wirkungsspezifisch zu erfassen.

3.3 Detektion von Fungiziden in pflanzlichen Lebensmitteln

Fungizide Wirkstoffe können auf der HPTLC-Platte sowohl mit Penicilliumsporen als auch mit Hefestämmen qualitativ und quantitativ postchromatographisch nachgewiesen werden. Neben dem qualitativen Nachweis von Fungiziden gelingt auch die quantitative Bestimmung fungizider Wirkstoffe auf

der Dünnschichtplatte unter Verwendung zellulärer Organismen.

3.3.1 Migrationsstrecken ausgewählter Fungizide in der AMD/HPTLC

Die Auftrennung der Substanzen in der Normalphasen-Dünnschichtchromatographie erfolgt wie in der Wasseranalytik mit einem Universalgradienten aufgrund ihrer Polarität mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik. Der Gradient ist ein 33-Stufengradient, basierend auf Dichlormethan, der mit Acetonitril als polare Komponente beginnt und mit n-Hexan als unpolare Komponente endet. Die 1. Identifikation und Bestimmung wird durch *in-situ*-Remissionsmessung bei 7 Wellenlängen (200–320 nm) durchgeführt. Eine mögliche Identifikation einzelner Stoffe erfolgt aufgrund der Lage im Chromatogramm und anhand der Remissionsspektren handelsüblicher Fungizide in einer Spektrenbibliothek. Tabelle 4 gibt die Migrationsstrecken von 16 Fungiziden an, die auf der Kieselgelplatte (HPTLC KG 60 F254, Format: 10 × 20 cm; Schichtdicke 200 µm) als stationäre Phase und bei einer AMD-Entwicklung mit dem Universalgradienten nach DIN 38407, Teil 11 erreicht werden.

3.3.2 Detektionsgrenze von Tebuconazol<sup>1</sup>

Da Tebuconazol ein sehr gut wirksames Fungizid darstellt, konnte nach der AMD-HPTLC auf dem Chromatogramm mit dem Hefestamm *Rhodoturula rubra* als Testorganismus eine Detektionsgrenze bei 1.8 ng/5 mm Band, die Erfassungsgrenze

<sup>1</sup> Seit 2001 wird in der Schadstoffanalytik den Azol-Derivaten eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Tebuconazol mit der chemischen Bezeichnung α-tert-Butyl-α-(4-Chlorphenylethyl)-1H-1,2,4-triazol-1-ylethanol gehört zur Gruppe der Triazole. Azol-Derivate werden in der Landwirtschaft vor allem zur Bekämpfung von Pilzkrankungen im Getreide- sowie im Obst- und Weinbau eingesetzt und zählen zu einer der wichtigsten Wirkstoffgruppen im Pflanzenschutz. Azole sind aber auch bei der Behandlung von systemischen Pilzinfektionen des Menschen von besonderer Bedeutung, da diese Wirkstoffe im Vergleich zu anderen Verbindungen gut verträglich und daher häufig die einzige therapeutische Alternative darstellen. In Anbetracht dieser Situation haben Mediziner der „Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft“ in jüngster Zeit Bedenken gegen den Einsatz von Azol-haltigen Pflanzenschutzmitteln erhoben. Es wurde die Vermutung geäußert, die wiederholte flächenmäßige Anwendung dieser Stoffe bewirke eine Selektion resistenter, potenziell humanpathogener Pilze in der Umwelt, die dann auf den Menschen übergehen und zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen führen könnten; durch Azol-Rückstände in der Nahrung könne eine Azol-Resistenz bei der Pilzflora von Mensch und Tier induziert werden (BgVV, 2001).

**Tab. 3** Häufig verwendete Testorganismen (Stahl, 1967; Hamburger und Cordell, 1987).

Stamm-Bezeichnung	Stamm-Nr. der ATCC <sup>1</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	ATCC 11778
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10240
<i>Microsporium gypseum</i>	ATCC 14683
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermis</i>	ATCC 12228

<sup>1</sup> American Type Culture Collection (ATCC) 12 301 Park Lawn Drive, Rockville Maryland, 20 852 USA

bei 3,6 ng/5 mm Band und die Bestimmungsgrenze bei 5,2 ng/5 mm Band ermittelt werden (Abb. 5).

### 3.3.3 Untersuchung der Lebensmittelproben auf Fungizide

Die postchromatographische Untersuchung auf Fungizide wurde mit *Penicillium*sporen als Testorganismus durchgeführt. *Penicillium*sporen weisen bei Wachstumsbedingungen von 25°C in einer feuchten Atmosphäre auf der Dünnschichtplatte eine grüne Eigenfärbung auf. Bei Anwesenheit eines fungiziden Wirkstoffes erscheint ein weißer Hemmhof, dessen Größe bestimmt wird durch die applizierte Menge und durch die Wirkungsspezifität des Fungizids. Das Chromatogramm mit *Penicillium*mycel wurde dokumentiert bei einer Beleuchtung der Dünnschichtplatte mit einer Lichtquelle von  $\lambda = 254$  nm. Die Hemmhöfe werden sichtbar durch den speziellen Phosphoreszenzindikator in der stationären Phase. Es können somit mit optischen Methoden belastete und unbelastete Lebensmittelproben direkt auf dem Chromatogramm unterschieden werden (Abb. 6).

Die Migrationsstrecken fungizider Wirkkomponenten werden mit den Migrationsstrecken der entsprechenden Referenzsubstanzen (Tab. 9) verglichen. Somit kann die Anzahl

möglicher Fungizide zu diesem Zeitpunkt schon eingeschränkt und eine Vorauswahl für die weitere Analytik getroffen werden (Tab. 4). Die Bestimmungsgrenze u.a. von Tebuconazol wurde mit der Wirkungsanalytik untersucht und liegt bei 5 ng pro Fleck; Carbendazim als aktiver Hauptmetabolit des Fungizids Benomyl konnte noch bei 80 ng pro Fleck nachgewiesen werden. Die wirkungsanalytische Bestimmungsgrenze von Procymidon lag bei 110 ng pro Fleck. Hiermit wird für diese Substanz die Zielvorgabe der zulässigen Höchstmenge von 5 mg/kg bei Erdbeeren und Salat erfüllt. Bei Proben mit einer zulässigen Höchstmenge von 0,02 mg/kg bedarf es einer weiteren Konzentrierung des Untersuchungsextraktes.

Die Liste mit den 32 Referenzsubstanzen (Tab. 4) ist in keinem Fall vollständig und soll nur die Möglichkeiten aufzeigen, inwieweit die wirkungsbezogene Analytik ein geeignetes Instrument darstellt, fungizide Wirkungsäquivalente in einer Lebensmittelprobe aufzuspüren. Selbst eine Auflistung der Migrationsstrecken von weiteren fungiziden Standardsubstanzen wird die Analytiker aufgrund physiko-chemischer Detektionsverfahren nicht davor bewahren, aktive Metabolite von Fungiziden zu übersehen, mit denen eine Lebensmittelprobe kontaminiert sein kann (siehe Abb. 6 und Tab. 5, Probe 3).

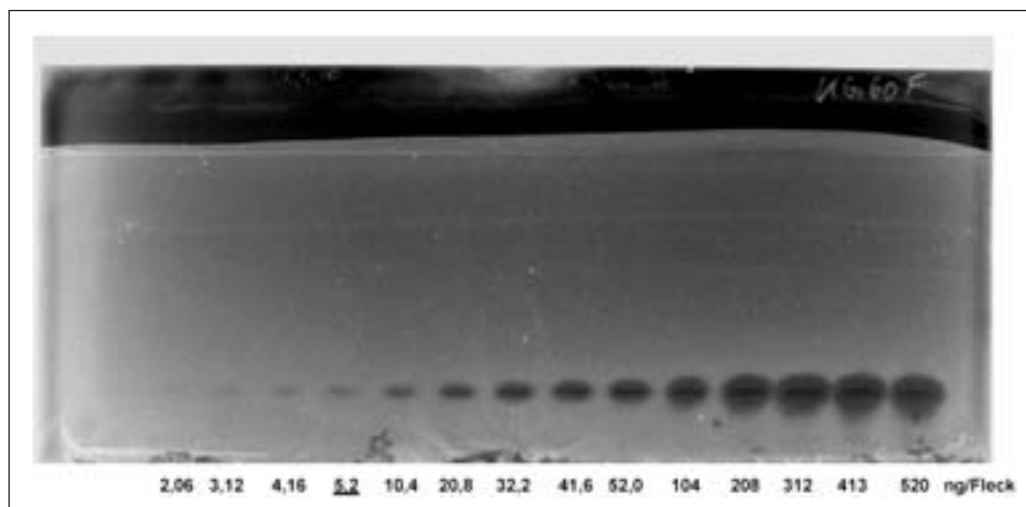
### 3.4 Einsatz des Biolumineszenzhemmtests für die Reinheitskontrolle von Referenzsubstanzen

Während das *in vitro* Testverfahren in der Regel die Summeneffekte von Schadwirkungen wiedergibt, ist eine Einzelstoffidentifizierung nicht möglich. Die Detektion mit einer Leuchtbakteriensuspension auf der HPTLC-Platte ermöglicht sowohl eine Einzelstoffanalyse als auch durch die Migrationsstrecke im Chromatogramm eine Charakterisierung unbekannter Schadstoffe. Pentachlorphenol (PCP) hemmt die Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri* sehr stark. Im Bereich von 20–80 ng/5 mm Band kann eine lineare Korrelation zur gemessenen Hemmwirkung auf der HPTLC Platte aufgezeigt werden. Die Nachweisgrenze von PCP liegt bei diesem Verfahren zwischen 10–20 ng/5 mm Band. Unterzieht man PCP einer

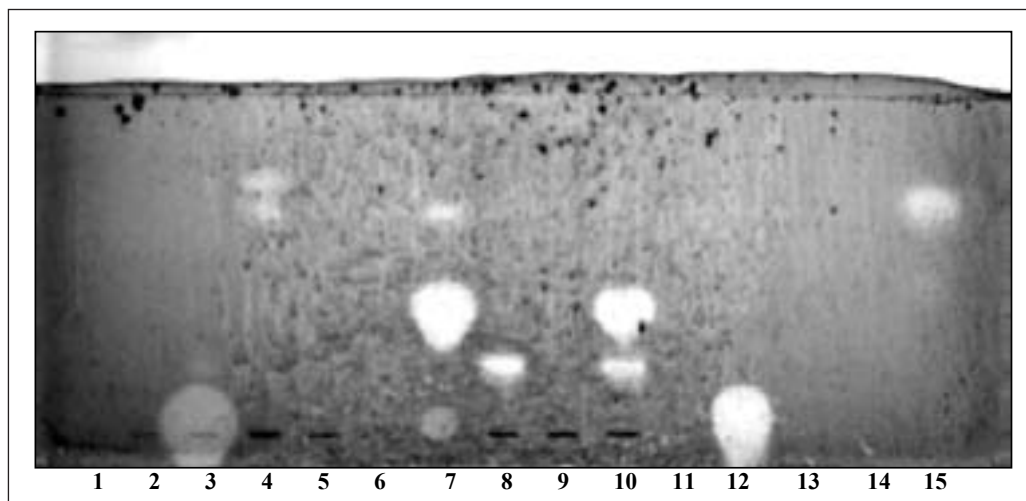
Fungizide	AMD-Migrationsstrecke	Fungizide	AMD-Migrationsstrecke
Aniliazin	55,3 mm	Iprodion	52,4 mm
Benalaxyl	30,3 mm	Myclobutanil	23,8 mm
Benomyl	58,4 mm	Oxadixyl	23,0 mm
Bitertanol	23,1 mm	Penconazol	24,8 mm
Bupirimat	26,8 mm	Prochloraz	23,6 mm
Captafol	53,7 mm	Procymidon	55,6 mm
Captan	52,2 mm	Propiconazol	24,0 mm
Carbendazim	21,4 mm	Pyrazophos	38,5 mm
Chlorthalonil	58,5 mm	Pyrimethanil	29,7 mm
Chlozolilat	55,0 mm	Quintozen	71,0 mm
Epoxiconazol	32,8 mm	Tebuconazol	24,9 mm
Fenarimol	23,8 mm	Tecnazen	69,7 mm
Fenpropidin	16,9 mm	Tolcophos-methyl	60,3 mm
Fenpropimorph	29,6 mm	Tolyfluamid	56,5 mm
Flusilazol	26,5 mm	Triadimefon	30,2 mm
Imazalil	18,5 mm	Vinclozolin	58,1 mm

**Tab. 4** Fungizide als Referenzsubstanzen und ihre Migrationsstrecken in der HPTLC-AMD, stationäre Phase (HPTLC KG 60 F254, Format: 10 × 20 cm; Schichtdicke 200 µm) mobile Phase (Universalgradienten nach DIN 38407, Teil 11).





**Abb. 5** Bestimmung der Detektionsgrenze von Tebuconazol, postchromatographisch auf der HPTLC-Platte; stationäre Phase: KG 60 F254s (MERCK, Art. Nr. 5365; Format: 10 × 20 cm; Schichtdicke 200 µm; chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2-Gerät von Camag (Muttens, Schweiz), Testorganismus: Hefestamm *Rhodotorula rubra*, Detektion nach 16 Stunden, dokumentiert mit einer Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), bei 254 nm.



**Abb. 6** Gegenwart von Fungiziden in verschiedenen pflanzlichen Lebensmittelproben: 1 = Kontrolle Erdbeeren; 2–5, 9 = Erdbeeren; 6 = Kontrolle Trauben; 7, 8, 10 = Trauben; 11–15 Standards: Fenpropathrin 30 ng, Imazalil 10 ng, Mercaptodimethur 30 ng, Procymidon 100 ng. Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), Testorganismus: *Penicillium*-sporen

Chemikalienüberprüfung mit einer postchromatographischen Hemmung der Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri* können unter diesen Testbedingungen weitere toxische Nebenprodukte bzw. Abbauprodukte in der Standardlösung aufgezeigt werden. In einer Standardlösung von PCP als Ausgangssubstanz können nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung auf Kieselgel (Abb. 7) noch 4 weitere toxische polarere Begleitsubstanzen (2, 3, 4, 5) nachgewiesen werden. Der Biolumineszenz/HPTLC-Test wurde erfolgreich validiert für Applikationen im Umweltbereich, für Naturstoffe, Lebensmittelproben und für toxikologisch relevante Probleme im industriell-produktiven Bereich (Eberz et al., 1996).

### 3.5 Detektion estrogener Verbindungen mittels transgener Hefen auf der HPTLC-Platte

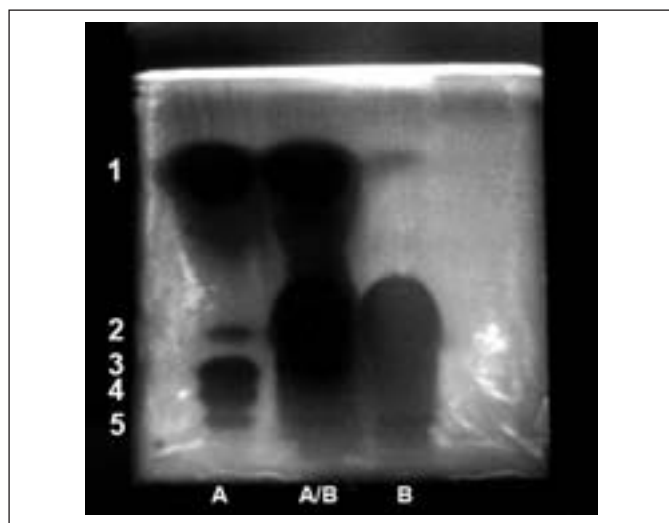
Beobachtungen der letzten Jahre lassen vermuten, dass verschiedene anthropogene Umweltkontaminanten einen schädigenden Effekt auf das Reproduktionsvermögen von wildlebenden Tierpopulationen haben. Hieraus leitet sich die Befürchtung ab, dass die Exposition mit solchen Stoffen auch beim Menschen zu Störungen der hormonellen Regulation

und zu gesundheitlichen Folgeschäden führen könnte. Für eine Reihe von Umweltkontaminanten werden vor allem eine estrogene und eine antiandrogene Wirkung auf den Organismus diskutiert. Stoffe mit solchen Wirkungen werden als „Endokrine Disruptoren“ bezeichnet.

Zu den sog. „Endokrinen Disruptoren“ [engl. endocrine disruptors (Eds), oder endocrine disrupting chemicals (EDCs)], auch Umwelt- oder Ökohormone genannt, zählen Substanzen und deren Metaboliten, die mit der Produktion, der Freisetzung, dem Transport und dem Abbau körpereigener Hormone sowie mit der Wirkung von Hormonen auf deren Rezeptoren konkurrieren. Es handelt sich um Umweltchemikalien, die in geringen Konzentrationen bereits in das hormonelle System von Menschen und Tieren eingreifen können (Kuch und Ballschmitter, 1999). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand gibt es über 200 Chemikalien, deren hormonelle Wirksamkeit bekannt ist. Allerdings wurde die estrogene Wirksamkeit bei vielen Umweltchemikalien eher zufällig durch ihr Vorkommen in der Umwelt oder durch Kontaminationsprobleme im Labor erkannt. Daher wird vermutet, dass weit mehr Substanzen endokrin wirksam sein könnten (Stroh, 2005).

Proben- Nummer	Fungizide Wirkung	Mögliche Fungizide
1	Keine	–
2	Keine	–
3	10 mm	keine Referenzsubstanz vorhanden oder aktiver Metabolit
4	54 mm, 59 mm	Procymidon, Vinclozolin
5	Keine	–
6	Keine	–
7	10 mm, 27–35 mm, 54 mm	keine Referenzsubstanz vorhanden oder aktiver Metabolit, Burpirimat, Epoxiconazol, Fenpropimorph, Flusilazol, Pyrimethanil, Triadimefon, Procymidon
8	22 mm	Carbendazim
9	Keine	–
10	22 mm, 27–35 mm	Carbendazim, Burpirimat, Epoxiconazol, Fenpropimorph, Flusilazol, Pyrimethanil, Triadimefon,

**Tab. 5** Auswertung der Proben 1–10 nach der wirkungsbezogenen Detektion (Abb. 5) auf mögliche Fungizide anhand der Migrationsstrecken von Referenzsubstanzen.



**Abb. 7** Postchromatographische Detektion von 1 µg Pentachlorphenol. (A) 1 µg 3'5'Dichlorphenol (B) durch Hemmung der Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri*, stationäre Phase HPTLC KG 60 F<sub>254</sub>, mobile Phase n-Hexan/Ethylacetat 6:4 v/v, Migrationsstrecke 5 cm, Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), Belichtungszeit 600 min

### 3.5.1 Bisherige biologische Testverfahren

Zur Überprüfung der estrogenen Wirksamkeit einer Substanz wurden zahlreiche biologische *in vivo*- und *in vitro*-Methoden entwickelt (Gülden et al., 1997). *In vivo*-Methoden sind sehr zuverlässig zur Überprüfung der estrogenen Aktivität von Substanzen. Bei ihnen werden alle Faktoren, die die estrogenen Wirkung der Substanzen beeinflussen können, berücksichtigt. Nachteilig ist, dass *in vivo*-Methoden meist teuer und zeitaufwendig sind (Andersen et al., 1998). Diese Tests geben nur die Summe der Wirkungen auf den Organismus wieder, nähere Informationen zu den Mechanismen der estrogenen Aktivität der Substanzen kann man daraus nicht erhalten (Shelby et al., 1996). *In vitro*-Methoden sind dagegen schneller, günstiger und in der Regel mit geringerem Aufwand durchzuführen als *in vivo*-Methoden. Einige der *in vitro*-Methoden werden

besonders als Screening-Methode eingesetzt (Andersen et al., 1998). Hierbei ist zu beachten, dass Ergebnisse aus den *in vitro*-Tests nicht einfach auf *in vivo*-Bedingungen übertragbar sind, da bei diesen Testverfahren keine korrekten Aussagen über die Bioverfügbarkeit und Wirkung auf den jeweiligen Organismen gemacht werden können.

Der Hefezellentest nach Sumpter wurde 1996 als ein *in vitro*-Test entwickelt zum Nachweis estrogen-wirksamer Substanzen. Durch molekularbiologische Methoden wurden fremde Gene in Bakterien, Hefezellen oder Säugetierzellen eingeschleust und dadurch estrogen-sensitive Zellen hergestellt. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein rekombinanter estrogensensitiver Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Diese Hefezellen wurden mit dem Gen für den menschlichen Estrogen-Rezeptor (hER) transformiert. Zusätzlich enthalten diese Hefezellen ein Expressionsplasmid. Dieses Plasmid besteht aus einer Estrogenrezeptor-bindenden DNA-Sequenz („estrogene responsive element“: ERE), dem Reporter-Gen Lac-Z<sup>1</sup> und einer Promotorsequenz (Routledge und Sumpter, 1997). In den Hefezellen wird der menschliche Estrogen-Rezeptor über das im Zellkern vorhandene hER-Gen synthetisiert. Gelangt eine estrogen wirksame Substanz in die Zelle, kann sie an den hER binden. Der entstandene Komplex bindet dann an das ERE im Plasmid. Durch diese Bindung wird die Transkription des Reporter-Gens Lac-Z ausgelöst und es kommt zur Produktion des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses wird in das Außenmedium ausgeschieden. Dem Medium wird ein chromogenes Substrat zugegeben, welches durch die  $\beta$ -Galaktosidase metabolisiert wird und zu einem farbigen Endprodukt führt.

### 3.5.2 Testverfahren auf der HPTLC-Platte

Müller, Dausend und Weins (2004) gelang es, den Hefezellentest von Routledge und Sumpter (1997) als Detektionsverfahren auf der HPTLC-Platte zu übertragen, mit dem Ziel estrogen wirksame Verbindungen direkt auf dem Chromatogramm zu detektieren. Basierend auf den beschriebenen Versuchsan-

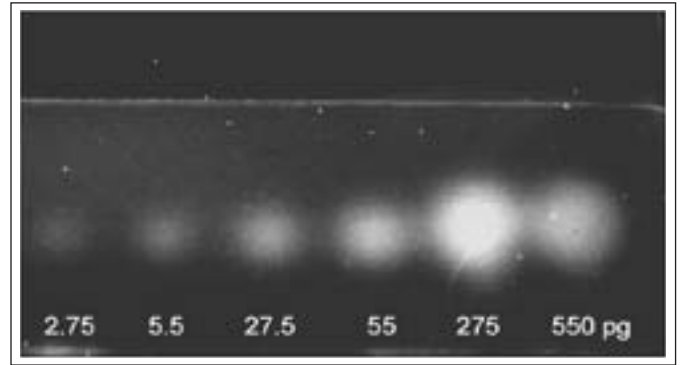
<sup>1</sup> Das Lac-Z-Gen stammt ursprünglich aus dem Laktose-Operon von *Escherichia coli* und ist das Strukturgen für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase (Knippers, 2001).

sätzen (siehe 3.3) gelang es, auch einen estrogensensitiven Hefestamm direkt auf der HPTLC-Platte zu kultivieren, wo in Gegenwart von estrogenen Substanzen die Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase induziert wird. Die Menge an induziertem Enzym ist abhängig von der Menge an estrogenwirksamen Verbindungen, die durch die Spaltung eines farbigen Substrats nachgewiesen werden kann. Als Standardsubstanz für estrogene Wirkung wurde das 17 $\beta$ -Estradiol eingesetzt. Die Testdauer konnte im Hinblick auf das *in vitro*-Testverfahren um 20 h verkürzt werden. Durch den Einsatz des fluorogenen Substrats 4-Methylumbellifery  $\beta$ -D-Galaktopyranosid (MUG) konnte die Inkubationszeit um die Hälfte reduziert und die Detektionsgrenze von 17 $\beta$ -Estradiol um den Faktor 20 gesteigert werden im Vergleich zu dem herkömmlichen Substrat Chlorophenol-Rot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (CPRG). Die Detektionsgrenze von 17 $\beta$ -Estradiol liegt unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen bei 5.5 pg/3 mm Band (Abb. 8).

Das Verhältnis zwischen dem Messsignal und dem Logarithmus der aufgetragenen Konzentration zwischen 2.75 und 550 pg 17 $\beta$ -Estradiol/3 mm Band ergibt eine typische sigmoide Dosis-Wirkungskurve. Somit ist dieser Test in der Lage, estrogenwirksame Substanzen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen. Die Migrationsstrecken im Chromatogramm erlauben die weitere Charakterisierung der estrogenaktiven Substanzen.

#### 4. Die wirkungsbezogene Analytik als Strategie zur Risikoanalyse und Risikobewertung

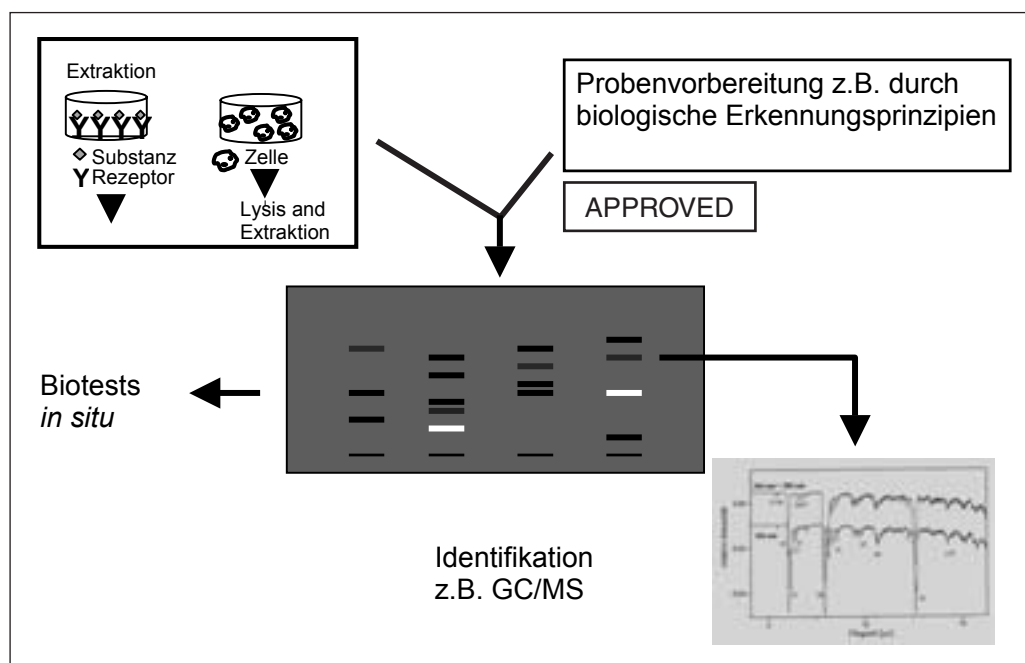
Die Dünnschichtchromatographie ist eine leistungsfähige, schnelle und preiswerte Analysenmethode. Sie hat sich in der Arzneimittel-, Lebensmittel- und Umweltanalytik bewährt. Gerade in der Lebensmittelanalytik mit ihrer stofflichen Vielfalt



**Abb. 8** Photographische Dokumentation der fluoreszierenden Zonen auf Kieselgel unter UV Licht ( $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$ ). Positiv Kontrolle von verschiedenen Konzentrationen 17  $\beta$ -Estradiol/Auftragefleck, Testorganismus: Estrogensensitiver Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Substrat: 4-Methylumbellifery  $\beta$ -D-Galaktopyranosid (MUG).

und unterschiedlichen Matrices erweist sich die Dünnschichtchromatographie und insbesondere die instrumentelle Dünnschichtchromatographie bis heute als eine geeignete Methode, diese Vielfalt an analytischen Fragestellungen zu beantworten. Die Methode wird insbesondere dann bevorzugt eingesetzt, wenn große Probenmengen in kurzer Zeit aufgearbeitet werden müssen. Dieses Trennverfahren eignet sich besonders für Stoffgemische aus genuinen Wirkstoffen und ihren entsprechenden Metaboliten. In einem Chromatogramm können z.B. 10 Proben mit unbekannten Schadstoffgehalten gleichzeitig mit 10 Testgemischen, die jeweils 8–10 Einzelsubstanzen enthalten, (d.h. mit insgesamt 80–100 Referenzsubstanzen) parallel untersucht werden (Butz und Stan, 1995).

Die Identifizierung der unbekannten Schadstoffe erfolgt zum einen durch den Vergleich des Retentionsfaktors der un-



**Abb. 9** Die wirkungsbezogene Analytik mit der HPTLC als Bindeglied zwischen Biotests und chemisch/physikalischen Analytik- und Identifizierungsverfahren.

bekannten Substanz mit denen von Referenzsubstanzen, zum anderen erfolgt eine Absicherung der Ergebnisse durch UV-Spektren bzw. durch Vermessen des Chromatogramms mit einem Mehrwellenlängenscan. Die Substanz kann anschließend durch Umsetzung mit chemischen Reagenzien auf dem gleichen Chromatogramm näher charakterisiert werden. Weitere Möglichkeiten des Pestizidscreenings mit Hilfe der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) wurden bereits aufgezeigt und Reagenzien wurden beschrieben, mit denen mikrochemisch Pestizide charakterisiert und identifiziert werden können (Patil und Shingare, 1993).

Bei den unterschiedlichen Anwendungsgebieten dient die wirkungsbezogene Analytik in der Dünnschichtchromatographie dazu, Wirkstoffe selektiv in verschiedenen und komplexen Matrices aufzufinden. Im Gegensatz zu der Einzelstoffanalytik erlaubt die Dünnschichtchromatographie eine Probenvorbereitung mit dem Ziel, möglichst alle organischen Bestandteile einer Probe zu erfassen. Sie ermöglicht sogar die Probenvorbereitung aus Rohextrakten oder nativen Proben während der Chromatographie auf der Platte mit der Vorgabe, möglichst alle organischen Inhaltsstoffe einer Probe zu erfassen.

Die Kombination von Biotests mit chemischer Analytik eröffnet neue Möglichkeiten zum Aufspüren und zur Risikoabschätzung von problematischen Spurenstoffen in der Umwelt insbesondere dadurch, dass mit verschiedenen suborganismischen Testverfahren Methoden zur Verfügung stehen, mit denen subletale (chronische) toxische (z.B. endokrine, mutagene oder kanzerogene) Wirkungen nachgewiesen werden können. Eine Weiterentwicklung der wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC besteht in der Identifizierung der Schadstoffe mit physikalischen Methoden, wie z.B. der Massenspektrometrie (Abb. 9). Dies kann zum einen durch sog. offline Verfahren (z.B. manuelles Übertragen der kritischen Substanzen in eine GC-MS Analyse) erfolgen oder in einer instrumentellen *in situ* Analyse durch die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-Technik, die im Bereich der DC- und MS-Technik bereits wichtige Vorarbeiten leisten konnte. Auch sollten biologisch/chemische Testverfahren *in vitro* und in ein Gesamtkonzept mit eingebunden werden, wobei die wirkungsbezogene Analytik auf dem Dünnschichtchromatogramm ein Bindeglied darstellt zwischen Biotests und chemisch/physikalischen Analytik- und Identifizierungsverfahren.

Grundlage der Risikoanalyse kann nach heutiger Einschätzung nur eine wirkungsbezogene Analytik sein, die eine Bewertung der Ergebnisse methodenübergreifend erfordert, d.h. mit chemisch-physikalischen, biologischen, biochemischen und molekularbiologischen Verfahren.

## 5. Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Collet sowie Herrn Lieser vom ehemaligen Institut für Gesundheit und Umwelt des Saarlandes Abt. G für die Überlassung der Lebensmittelextrakte und die lebhaft Diskussion.

## 6. Literatur

- Andersen, H. R., Andersson, A. M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., Bjerregard, P., Christiansen, L. B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E. B., Korsgaard, B., Le Guevel R., Leffers, H., McLachlan J., Moller, A., Nielsen, J. B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K. L., Perez, P., Stakkeboek, N. E., Sonnenschein, O. und Soto, A. M. (1998), Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormonedisrupting chemicals. *Environm Health Perspect* 107 Suppl. 1:89-108.
- Anderson, C. R., Rupp, H. S. und Wu, W. H. (2005) Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, clean up, and liquid chromatography. *J Chromatograph A* 1075:23-32.
- BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (2001) Problematik der Entwicklung von Resistenzen humaner Mykosen gegenüber Azol-Antimykotika und eventueller Wechselwirkungen mit den als Fungizid eingesetzten Pflanzenschutzmitteln. Bericht des BgVV vom 7.6.2001.
- Butz, S. und Stan, H.-J. (1995) Screening of 265 pesticides in water by thin-layer chromatography with automated multiple development. *Anal Chem* 67:620-630.
- Eberz, G., Rast, H.-G., Burger, K., Kreiss, W. und Weisemann, C. (1996) Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling. *Chromatographia* 43:5-9.
- Eymann, R., Fischer, W., Hauck H. E. und Weins, C. (2001) Nachweis von Antibiotika in Futtermitteln durch wirkungsbezogene Analytik. *Fleischwirtschaft* 8:95-96.
- Fent, K. (1998) Ökotoxikologie. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 3.
- Geike, F. (1969) Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis und zum Wirkmechanismus von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden. *J Chromatogr* 44:95-102.
- Geike, F. (1970) Insektizide- und Antiesterase-Wirkung von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden nach UV-Bestrahlung. *Z Angew Entomol* 65:98-101.
- Geike, F. (1972) Verfahren zum dünnsschichtchromatographisch-enzymatischen Nachweis von Schwermetallen mit Urease. *Fresenius Z Anal Chem* 258:284-285.
- Geike, F. (1973) Dünnschichtchromatographischer Screening-Test über die Hemmeigenschaften von Phenylharnstoff-Herbiziden gegenüber einigen Enzymen. *J Chromatogr* 87:199-210.
- Geike, F. (1974) Thin-layer chromatographic method for the detection of the  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase inhibitors. *Fresenius Z Anal Chem* 270:366-367.
- Geike, F. (1975) Simple screening-test for the detection of lactoperoxidase inhibitors. *Fresenius Z Anal Chem* 276:77-78.
- Gülden, M., Turan, A. und Seibert, H. (1997) Endocrinically active substances in surface waters. German Environmental Protection Agency Research Report No. UBA-FB 97-068.
- Hamburger, O. M. und Cordell, G. A. (1987) A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *J Nat Prod* 50:25-29.
- Herzprung, P. (1991) Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung. Dissertation an der TU München (Prof. Nießner).
- Hostettmann, K., Terreaux, C., Marston, A. und Potterat, O. (1997) The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *JPC-J Planar Chromat* 10:251-257.
- Knippers, R. (2001) Molekulare Genetik. 8. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kuch, H. und Ballschmiter, K. (1999) Hormonell wirksame Verbindungen in der Umwelt Baden-Württembergs. Arbeitsbericht Nr. 151, Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg, ISBN 3-932013-93-x.
- Mendoza, G. E. und Schields, J.B.(1973) Determination of some carbamates by enzyme-inhibition techniques using thin layer chromatography and colorimetry. *J Agric Food Chem* 21:178-184.



- Mueller, M. B., Dausend, C., Weins, C. and Frimmel, F.H. (2004) A new bioautographic screening method for detection of estrogenic compounds. *Chromatographia* 60:207–211.
- Patil, V. B. und Shingare, M. S. (1993) Thin-layer chromatographic detection of organophosphorus insecticides containing a nitrophenyl group. *J AOAC Int* 76:1394–1395.
- Routledge, E. J. und Sumpter, J. P. (1997) Structural features of alkylphenolic chemical associated with estrogenic activity. *J Biol Chem* 272:3280–3288.
- Shelby, M. D. et al. (1996) Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect* 104:1296–1300.
- Stahl, E. (1967) *Dünnschichtchromatographie*. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Stroh, K. (2005) Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung. BayLfU 2005 – PS1/Umweltberatung Bayern. Herausgeber: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Bürgermeister-Ulrich-Straße 160, 86179 Augsburg.
- Weins, C. und Jork, H. (1996) Toxicological evaluation of harmful substances by *in situ* enzymatic and biological detection in high performance thin-layer chromatography. *J Chromatography A* 750:403–407.
- Weins, C. und Jork, H. (1994) Toxikologische Bewertung von Schadstoffen in der Trinkwasseranalytik durch enzymatische *in situ* Detektion in der Dünnschichtchromatographie. *Vom Wasser* 83:279–288.
- Weissbuch der Europäischen Kommission (2000) Weissbuch zur Lebensmittelsicherheit. pp. 719.



To access this journal online:  
<http://www.birkhauser.ch>

---